



**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN EN SEGMENTOS
NODALES DE *Guadua angustifolia* PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL
CULTIVO *in vitro***

**PRESENTADO POR:
LORENA ALEXANDRA RAMÍREZ CORREA**

**ASESORADO POR:
NIDIA ELIZABETH CARREÑO GONZALEZ
JAIRO ENRIQUE GRANADOS MORENO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Especialista en Biotecnología Agraria**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA- UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA
BOGOTÁ, D.C. 2013**

RESUMEN

El establecimiento del cultivo *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* presenta como principal inconveniente la contaminación por microorganismos, causando pérdidas biológicas y económicas. Este trabajo fue desarrollado en el Centro Nacional para el Estudio del Bambú-Guadua, en Córdoba, Quindío y financiado por La Corporación Autónoma Regional del Quindío (C.R.Q). Se evaluaron seis tratamientos para la desinfección de los explantes de guadua con hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones del 2% y 3%, cada uno en tiempos de aplicación de 5, 10 y 15 minutos, posteriormente los explantes fueron sembrados en el medio de cultivo Murashige y Skoog, suplementado con 6-BAP a razón de 3mg/L. También se valoró el porcentaje de brotación. El mejor resultado de desinfección y de brotación se obtuvo con el NaClO al 2% durante 15 minutos.

Palabras clave: *Guadua angustifolia*, explante, cultivo *in vitro*, hipoclorito de sodio, desinfección, brotación.

ABSTRACT

The establishment of *in vitro* nodal segments of *Guadua angustifolia* has the main disadvantage of contamination by microorganisms, causing biological and economic losses. This work was done at the National Center for the Study of Bamboo-Guadua, located in Córdoba, Quindío and funded by the Autonomous Regional Corporation of Quindío (CRQ). For the disinfection of explants of guadua, six treatments with sodium hypochlorite (NaClO) at a concentration of 2% and 3% with application times of 5, 10 and 15 minutes were evaluated. Subsequently, the explants were planted in Murashige and Skoog media, supplemented with 3 mg/L of 6-BAP. The percentage of sprouting was also studied. The best result of disinfection and germination rate was obtained with 2% NaOCl for 15 minutes.

Keywords: *Guadua angustifolia*, explant, *in vitro* culture, sodium hypochlorite disinfection, sprouting.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	0
2. MARCO TEÓRICO.....	1
2.1. Aspectos Históricos del Cultivo <i>in vitro</i>	1
2.2. Ventajas del Cultivo de Tejidos Vegetales.....	2
2.3. Fases del cultivo <i>in vitro</i>	3
2.4. Aspectos generales de las condiciones de la siembra en cultivo de tejidos vegetales	4
2.4.1 Medios de cultivo para la micropropagación	4
2.4.2 Desinfectantes empleados en la micropropagación de tejidos vegetales	5
2.4.2.1 Hipoclorito de sodio.....	6
2.4.2.2 Alcoholes.....	7
2.5 Limitantes del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Guadua angustifolia</i>	8
2.5.1 Aspecto fitosanitario o sanidad del cultivo <i>in vitro</i>	8
2.6 Aspectos generales del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Guadua angustifolia</i>	8
2.6.1 Medio de cultivo	8
2.7 Otras investigaciones sobre el cultivo <i>in vitro</i> de bambú	10
3 METODOLOGÍA.....	12
3.4 Evaluación de los tratamientos de desinfección	12
3.1.1 Selección y siembra de los segmentos nodales de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth.	12
3.1.2 Predesinfección de los explantes	13
3.1.3 Tratamientos de desinfección de los explantes	13
3.1.4 Siembra de los explantes	15
3.1.5 Incubación y evaluación de los explantes.....	16
3.1.6 Análisis estadístico	17

3.1.7 Variables Evaluadas.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1 Evaluación de los tratamientos de desinfección	18
4.1.1 Evaluación de la contaminación	18
4.1.2 Evaluación de la brotación.....	20
4.1.3 Evaluación de segmentos nodales no promisorios.....	21
4.2 Análisis del tratamiento de NaOCl 2% en relación al tiempo de exposición de los explantes.....	22
4.2.1 NaOCl 2% durante 5 minutos	23
4.2.2 NaOCl 2% durante 10 minutos	25
4.2.3 NaOCl 2% durante 15 minutos	28
4.3 Análisis del tratamiento de NaOCl 3% en relación al tiempo de exposición de los explantes.....	32
4.3.1 NaOCl 3% durante 5 minutos	32
4.3.2 NaOCl al 3% durante 10 minutos	35
4.3.2 NaOCl al 3% durante 15 minutos	38
5. CONCLUSIONES.....	44
6. RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rodal de <i>G. angustifolia</i>	1
Figura 2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>G. angustifolia</i>	9
Figura 3. Plantas madre de <i>G. angustifolia</i> en condiciones de invernadero	12
Figura 4. Segmento nodal en planta madre de <i>G. angustifolia</i>	12
Figura 5. Pre-lavado de los explantes de <i>G. angustifolia</i>	13
Figura 6. Segmentos nodales desinfectados listos para la siembra en cultivo <i>in vitro</i>	14
Figura 7. Siembra de segmentos nodales de <i>G. angustifolia</i> en cabina de flujo laminar.	16
Figura 8. Segmentos nodales contaminados por bacterias	19
Figura 9. Segmentos nodales de <i>Guadua angustifolia</i> en brotación.....	20
Figura 10. Segmentos nodales de <i>Guadua angustifolia</i> no promisorios	22
Figura 11. Segmentos nodales de <i>Guadua angustifolia</i> en brotación.....	36
Figura 12. Segmentos nodales de <i>Guadua angustifolia</i> en brotación.....	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de desinfección aplicados a los segmentos nodales de <i>Guadua angustifolia</i>	14
Tabla 2. Composición del medio MS	15
Tabla 3. Variables evaluadas en el experimento	17

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Contaminación de los segmentos nodales de <i>G. angustifolia</i> por tratamientos de desinfección aplicados	18
Grafica 2. Brotación de los segmentos nodales de <i>G. angustifolia</i> por tratamientos de desinfección aplicados	20
Grafica 3. Segmentos nodales no promisorios de <i>G. angustifolia</i> por tratamientos de desinfección aplicados	21
Grafica 4. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación con el tratamiento NaClO 2% x 5 minutos	23
Grafica 5. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación con el tratamiento NaClO 2% x 5 minutos.....	24
Grafica 6. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios con el tratamiento NaClO 2% x 5 minutos	25
Grafica 7. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación con el tratamiento NaClO 2% x 10 minutos	26
Grafica 8. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación con el tratamiento NaClO 2% x 10 minutos.....	26
Grafica 9. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios con el tratamiento NaClO 2% x 10 minutos ...	27
Grafica 10. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación con el tratamiento NaClO 2% x 15 minutos	28
Grafica 11. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación con el tratamiento NaClO 2% x 15 minutos.....	29
Grafica 12. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios con el tratamiento NaClO 2% x 15 minutos ...	30
Grafica 13. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación con el tratamiento NaClO 3% x 5 minutos	32

Grafica 14. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación con el tratamiento NaClO 3% x 5 minutos.....	33
Grafica 15. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios con el tratamiento NaClO 3% x 5 minutos.....	34
Grafica 16. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación el tratamiento NaClO 3% x 10 minutos	35
Grafica 17. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación el tratamiento NaClO 3% x 10 minutos	36
Grafica 18. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios el tratamiento NaClO 3% x 10 minutos.....	37
Grafica 19. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación el tratamiento NaClO 3% x 15 minutos	38
Grafica 20. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación el tratamiento NaClO 3% x 15 minutos	39
Grafica 21. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios el tratamiento NaClO 3% x 15 minutos	40

1. INTRODUCCIÓN

La guadua es una especie forestal que puede brindar múltiples beneficios ambientales, económicos, sociales y culturales; es usada en la construcción y en la elaboración de artesanías. En ecosistemas forestales, la guadua hace grandes aportes de biomasa, contribuye a enriquecer y mejorar la textura y estructura del suelo, proporciona un mayor anclaje evitando la erosión, y ayuda a la regulación de los caudales (Giraldo y Sabogal, 2007).

La técnica de cultivo de tejidos vegetales consiste en aislar un explante y proporcionarle artificialmente condiciones físicas y químicas; para que las células expresen su potencial intrínseco; es necesaria la adición de hormonas y la adopción de procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Roca y Mroginski, 1991).

Se utiliza la micropropagación como la principal biotécnica aplicada a varias especies de bambú. Sin embargo la *Guadua angustifolia* aún no cuenta con protocolos eficientes de micropropagación (Cruz *et al.*, 2007), debido a que presenta como principal inconveniente la contaminación por bacterias, causando pérdidas biológicas y económicas (Leifert *et al.*, 1991), tanto en la micropropagación comercial, como en los trabajos de investigación (Fonturbel, 2001). En la fase de establecimiento de especies leñosas, el explante inicial constituye la principal fuente de contaminación, debido a las características anatómicas propias de las especies (Cruz, 2007)

Es por estas razones que se plantea el uso del hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones y variados tiempos de exposición para la desinfección de los segmentos nodales de *Guadua angustifolia* y así determinar las condiciones para el establecimiento *in vitro* de esta especie.

2. MARCO TEÓRICO



Figura 1. Rodal de *G. angustifolia*

Fuente: Ramírez (2009).

2.1. Aspectos Históricos del Cultivo *in vitro*

En 1838, Schleiden & Schwan fueron los primeros en postular que cada célula viva de un organismo multicelular podría estar en capacidad de desarrollarse, si se le proporcionan las condiciones apropiadas, es decir, células individuales de un organismo totipotentes (Montoya, 1991).

La teoría de Sachs & Knops (1860) dice que los principales nutrientes inorgánicos de la planta y la consiguiente preparación de soluciones nutritivas se considera un gran aporte a las técnicas de cultivo *in vitro* (Montoya, 1991).

A pesar de que los primeros intentos de cultivo *in vitro* fueron realizados en células animales, se ha considerado que Haberlandt (1902) fue el pionero de la aplicación de la técnica en plantas, a pesar de no haber cultivado exitosamente células vegetales aisladas (Roca y Mroginski, 1993).

2.2. Ventajas del Cultivo de Tejidos Vegetales

La micropropagación vegetal constituye dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos de fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* (Pérez, 1998) y la ingeniería genética (Herrera, 1998).

Cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica que involucra diferentes técnicas de cultivo de plantas, protoplastos, células, tejidos y órganos vegetales; mediante la cual es posible obtener plantas libres de microorganismos, en un medio de cultivo nutritivo y aséptico, en condiciones ambientales controladas. (Rey *et al.*, 2009)

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que cada célula, posee la capacidad de originar el desarrollo y crecimiento de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Durante la reproducción asexual las células se dividen mitóticamente de manera sucesiva generando las etapas de crecimiento y desarrollo. La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que las mismas poseen un genotipo idéntico al de la célula madre. (Rey *et al.*, 2009); así las células vegetales pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

1. Una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo, la cual si se crean las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos.

2. Una respuesta morfogenética por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos).

La primera respuesta se conoce como organogénesis o embriogénesis indirecta (mediada por un estado de callo), mientras que la segunda respuesta se considera organogénesis o embriogénesis directa. (Rey *et al.*, 2009).

2.3. Fases del cultivo *in vitro*

La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido como callo, yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales. (Rey *et al.*, 2009)

Murashige (1974), propone que es de manera útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de los vegetales, mediante la técnica de cultivo aséptico, tal como se describe a continuación:

Etapa I. Es la etapa de establecimiento o iniciación, donde se establece el cultivo inicial o primario.

Etapa II. Es la fase de multiplicación de brotes.

Etapa III. Fase donde se da el enraizamiento o etapa de pretrasplante; su objetivo permite obtener una planta autótrofa, que presente características de sobrevivencia cuando se trasplante al suelo.

Por otra parte Roca y Mroginski (1991), en concordancia con la sugerencia de Krikorian (1982) quien considera otras dos etapas adicionales, propone completar el procedimiento, así:

Incluir la etapa 0 o etapa inicial, donde se realiza la selección de la planta madre

de buenas condiciones físicas y de sanidad.

Adicionar la Etapa IV, o fase de endurecimiento; en la cual se presenta la transferencia final a la etapa del medio ambiente.

2.4. Aspectos generales de las condiciones de la siembra en cultivo de tejidos vegetales

2.4.1 Medios de cultivo para la micropropagación

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Roca y Mroginski (1991) y Murashige (1974), recomiendan que un medio de cultivo ideal deberá contener macrosales, microsales, acompañadas de carbono, vitaminas, agente gelificante y sustancias reguladoras de crecimiento. Según los resultados encontrados por estos autores, es importante revisar los siguientes aspectos:

Para el caso del carbono es importante considerar que muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar: sacarosa, glucosa o fructosa. La incorporación de mioinositol al medio generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares. (Roca y Mroginski, 1991)

Con relación a las vitaminas, si bien los medios de cultivo contienen varias de éstas, es probable que en forma general solo sea esencial la incorporación de la tiamina. (Roca y Mroginski, 1991)

En cuanto al agente gelificante: en los medios semisólidos se adiciona agar. Se debe considerar la pureza para no alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos. (Roca y Mroginski, 1991)

Por otra parte, se hace necesario agregar al medio de cultivo hormonas reguladoras del crecimiento como las auxinas o las citoquininas. Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-D, ANA, AIA y AIB; en el caso de las citoquininas comúnmente se emplean KIN, BAP, y ZEA. (Roca y Mroginski, 1991)

Con relación a otros componentes, el empleo de sustancias antioxidantes, puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En estos casos es útil usar soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos a baja intensidad de luz o en la oscuridad. (Roca y Mroginski, 1991)

En cuanto a su contenido en sales, los medios se especifican según la concentración de los macronutrientes y los micronutrientes en su composición. El medio de cultivo propuesto por Murashige (1962), se caracteriza por altos contenidos de sales y el medio de White (1943), se considera bajo en sales. (Roca y Mroginski, 1991)

2.4.2 Desinfectantes empleados en la micropropagación de tejidos vegetales

La finalidad de los desinfectantes es destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, sin alterar la estructura celular de los tejidos vivos. El desinfectante interactúa con la membrana celular del microorganismo, seguida de la penetración dentro de la célula y luego su acción sobre un blanco, alterando las funciones normales del microorganismo. (Sánchez *et al.*, 2005)

En general el mecanismo de acción de los desinfectantes depende de tres mecanismos básicos: 1. Capacidad de coagular y precipitar proteínas, 2. Alterar las características de permeabilidad celular, 3. Toxicidad o envenenamiento de los

sistemas enzimáticos de las bacterias. Estos pueden producir la muerte o inhibición celular de las bacterias por oxidación, hidrólisis o inactivación de enzimas, con pérdida de los constituyentes celulares. (Sánchez *et al.*, 2005)

Existe una estrecha correlación entre la concentración del agente desinfectante y el tiempo necesario para matar una determinada fracción de la población bacteriana. Si se modifica la concentración se provocan cambios en el tiempo para lograr un mismo efecto. Refiriéndose al tiempo, no todas las bacterias mueren simultáneamente, ni siquiera cuando se aplica un exceso del agente. (Sánchez *et al.*, 2005)

Los agentes desinfectantes más empleados en la micropropagación vegetal, teniendo en cuenta su bajo costo, fácil adquisición y menor efecto fitotóxico sobre los tejidos son el hipoclorito de sodio y el alcohol al 70%.

2.4.2.1 Hipoclorito de sodio

El cloro es un potente agente germicida con amplio espectro de actividad, frente a bacterias, esporas, hongos, virus y protozoos. Presenta efectos bactericidas rápidos, es un agente oxidante que inactiva proteínas enzimáticas. (Sánchez *et al.*, 2005)

El hipoclorito tiene como mecanismo de acción sobre los microorganismos la inhibición de las reacciones enzimáticas y desnaturalización de las proteínas. (Sánchez *et al.*, 2005). Este compuesto actúa como un solvente de materia orgánica, especialmente de ácidos grasos, a quienes transforma en sales de ácidos grasos (jabones) y glicerol, reduciendo la tensión superficial de la solución remanente. Además, el hipoclorito de sodio neutraliza los aminoácidos, formando agua y sales. Con la disminución de iones hidroxilo (OH), mediante la formación

de agua, se reduce el pH, estimulando la presencia de ácido hipocloroso que en contacto con componentes orgánicos actúa como solvente, libera cloro que se combina con el grupo amino de las proteínas, formando cloroaminas. El ácido hipocloroso y los iones hipoclorito (OCl^{-1}) llevan a la degradación e hidrólisis de los aminoácidos. (Minambiente, 2013)

2.4.2.2 Alcoholes

Son compuestos orgánicos del agua, conocidos desde la antigüedad y usados como antisépticos de limpieza y desinfección. Además de la actividad antimicrobiana, son un buen solvente de otros productos, entre ellos muchos antisépticos y desinfectantes, potenciando su actividad. (Sánchez *et al.*, 2005)

Los alcoholes poseen una rápida acción y amplio espectro de actividad, actuando sobre bacterias gramnegativas y grampositivas, incluyendo micobacterias, hongos y virus, pero no son esporicidas. (Sánchez *et al.*, 2005). El mecanismo de acción consiste en destruir la membrana celular y desnaturalizar las proteínas. Su eficacia está basada en la presencia de agua, esto se debe a que estos compuestos acuosos penetran mejor en las células y bacterias permitiendo así el daño a la membrana y rápida desnaturalización de las proteínas con la consiguiente interferencia en el metabolismo y lisis celular. (Sánchez *et al.*, 2005)

Los alcoholes habitualmente usados son el alcohol etílico o etanol y el alcohol isopropílico. Las concentraciones varían entre el 70% y el 96% para el primero, y entre el 70% y el 100% para el segundo. Aunque sus aplicaciones son idénticas se suele usar habitualmente el etanol por ser menos irritante. (Sánchez *et al.*, 2005)

2.5 Limitantes del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia*

2.5.1 Aspecto fitosanitario o sanidad del cultivo *in vitro*

En *Guadua angustifolia* Kunth se presentan dos problemas principales en la fase de establecimiento: la necrosis de los explantes, debido a la oxidación del material vegetal y la presencia de microorganismos contaminantes tanto hongos como bacterias (Cruz *et al.*, 2007). Se han identificado los géneros bacterianos que causan los mayores reportes de contaminación en los segmentos nodales de *Guadua angustifolia* en el establecimiento del cultivo *in vitro*, el género *Pseudomonas* es causante del 26.8% de la contaminación en los segmentos nodales basales y el 26.6% de la contaminación en los segmentos nodales medios es debido a una asociación entre los géneros *Pseudomonas* y *Erwinia*. (Ramírez *et al.*, 2009). De igual forma fue identificado el género *Bacillus* como contaminante de alta frecuencia de aparición en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* y se encontró que la bacteria muestra sensibilidad al sulfato de gentamicina en una mínima concentración inhibitoria (MCI) de 1µg/ ml. (Cruz *et al.*, 2007)

2.6 Aspectos generales del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia*

2.6.1 Medio de cultivo

Para el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* el medio de cultivo empleado es el Murashige y Skoog (MS), rico en macronutrientes como Magnesio, nitrógeno, fósforo, potasio y micronutrientes como el manganeso, cobalto y zinc. El medio de cultivo es suplementado con Bencil amino purina (BAP), como regulador

de crecimiento del segmento nodal de guadua y con sacarosa como fuente de carbono. Las vitaminas que se adicionan son la tiamina y ácido nicotínico, como agente antioxidante. (Tabla 2)

2.7.2 Desinfección

Se han estudiado diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y variados tiempos de exposición con fines de desinfección de los explantes de *Guadua angustifolia*. Sin embargo, aún no se ha logrado obtener un protocolo unificado para esta especie, debido a que la desinfección de los explantes es más compleja para especies leñosas, y es extremadamente dependiente del origen, es decir, de las plantas madre, ya que estas se encuentran en diversos ambientes, donde influyen factores bioclimáticos, el pH del suelo y las condiciones fitosanitarias en las que se cultivan estas plantas. Tales circunstancias alteran las condiciones endógenas del explante, y hacen que cada planta sea única y por lo tanto, sea necesario formular un protocolo de desinfección para el establecimiento en el cultivo *in vitro*.



Figura 2. Cultivo *in vitro* de *G. angustifolia*

Fuente: Ramírez (2009).

Son pocos los investigadores del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia* (Figura 2), que reportan diferentes tratamientos de desinfección para los segmentos nodales de *Guadua*, como la utilización de métodos de desinfección con hipoclorito de sodio al 2% por 5, 10 y 15 minutos, y como complemento se ha realizado la repetición de estos mismos tratamientos a las 24 horas, como ha sido reportado por Borges *et al.*, 2004, demostrando que la doble desinfección con una concentración del 2% de NaOCl durante 5 minutos, es la más adecuada para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios, con diferencias altamente significativas en cuanto a los demás tratamientos realizados.

Por otra partes en esta especie, usando otros desinfectantes, se ha empleado el bicloruro de mercurio como agente desinfectante al 0.3% durante 5 y 10 minutos y el hipoclorito de sodio al 2% durante 10, 15 y 20 minutos en la desinfección de las yemas nodales (Lárraga. 2011) obteniendo el mejor resultado con bicloruro de mercurio al 0.3% durante 10 minutos. (Marulanda *et al.*, 2005).

Alternamente se ha realizado la desinfección de yemas axilares con una combinación de fungicidas y bactericidas y posterior sumergimiento de los explantes en hipoclorito de sodio al 1.5% durante 10 minutos (Jiménez *et al.*, 2006). Igualmente se ha realizado la desinfección de los segmentos nodales con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos. (Freire *et al.*, 2011)

2.7 Otras investigaciones sobre el cultivo *in vitro* de bambú

A lo largo de los años y del aumento en el interés del hombre por multiplicar masivamente plantas como los bambúes que brindan amplios beneficios

ambientales, económicos y culturales, se han desarrollado variadas investigaciones en aspectos que abarcan la complejidad del cultivo *in vitro*.

Son pocos los autores que reportan diferentes tratamientos de desinfección en las diferentes especies de bambúes, como es el caso de *Bambusa vulgaris*, en donde se han realizado tratamientos en las plantas madre con fungicidas y la desinfección de yemas axilares con hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min. (García *et al.*, 2010). Para este mismo género, se han empleado las concentraciones del 1%, 2%, y 3% durante 10, 15, y 20 min con hipoclorito de sodio, obteniendo el mayor porcentaje de descontaminación de los explantes con el hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min. (García *et al.*, 2007). Además se ha realizado desinfección de segmentos nodales de *Gynerium sagittatum* hipoclorito de sodio al 1.25% durante 20 minutos, obteniendo altos porcentajes de plantas establecidas y menores índices de contaminación. (Suárez *et al.*, 2009)

3 METODOLOGÍA

3.4 Evaluación de los tratamientos de desinfección

3.1.1 Selección y siembra de los segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth.

Esta investigación se realizó en el Centro Nacional para el Estudio del bambú – Guadua, en Córdoba Quindío, en donde se desarrolla su micropropagación.

Las plantas madre se mantuvieron bajo condiciones de invernadero (Figura 3) y bajo excelentes condiciones fitosanitarias, a una temperatura promedio de 28°C. Fueron regadas dos veces a la semana con agua destilada, y fumigadas con productos bacteriostáticos y fungistáticos con el fin de disminuir la contaminación en el cultivo *in vitro* por hongos y bacterias. Así mismo, fueron podadas con regularidad para estimular la acción de las auxinas en la brotación de las yemas usadas como explantes. Los segmentos nodales fueron tomados de varas largas sin ramificar (Figura 4), y cortados con tijeras podadoras desinfectadas con alcohol al 70%.



Figura 3. Plantas madre de *G. angustifolia* en condiciones de invernadero
Fuente: Ramírez (2009).



Figura 4. Segmento nodal en planta madre de *G. angustifolia*
Fuente: Ramírez (2009).

3.1.2 Predesinfección de los explantes

Los explantes fueron sometidos a un pre lavado en 1 L de agua destilada estéril con jabón líquido (5 ml), yodo quirúrgico (10 ml), L-Cisteína (5 mg) y Tween 20 (1 ml) por 15 minutos, con agitación constante (Figura 5) y se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

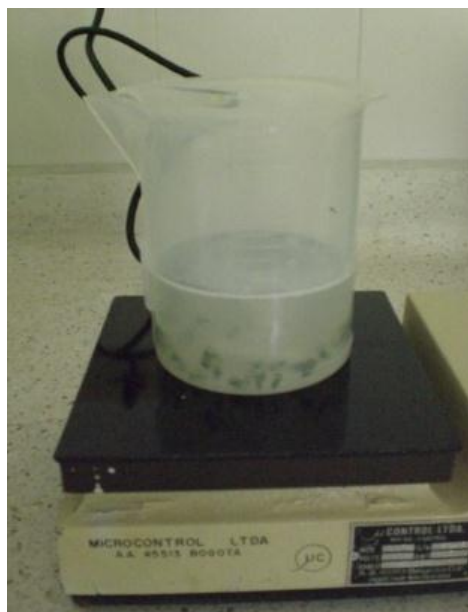


Figura 5. Pre-lavado de los explantes de *G. angustifolia*

Fuente: Ramírez (2009).

3.1.3 Tratamientos de desinfección de los explantes

Después del tratamiento de predesinfección de los explantes, en cabina de flujo laminar (Figura 6), fueron desinfectados de acuerdo a los tratamientos especificados en la Tabla 1.



Figura 6. Segmentos nodales desinfectados listos para la siembra en cultivo *in vitro*.

Fuente: Ramírez (2009).

Tabla 1. Tratamientos de desinfección aplicados a los segmentos nodales de *Guadua angustifolia*.

TTO	CANTIDAD DE EXPLANTES (UND)	DESINFECCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN MINUTOS	DESINFECCIÓN	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN MINUTOS
1	100	Etanol	2	NaClO	2%	5
2	100	Etanol	2	NaClO	2%	10
3	100	Etanol	2	NaClO	2%	15
4	100	Etanol	2	NaClO	3%	5
5	100	Etanol	2	NaClO	3%	10
6	100	Etanol	2	NaClO	3%	15

Fuente: Ramírez (2009)

Como se aprecia en la tabla 1, se utilizaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio, para obtener seis tratamientos así: NaOCl al 2% con diferentes tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos), y NaOCl al 3% con diferentes tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos).

3.1.4 Siembra de los explantes

La siembra de los explantes de *Guadua angustifolia* se realizó en el Centro Nacional para el Estudio del Bambú-Guadua, en Córdoba, Quindío. Se sembraron 600 explantes de *Guadua angustifolia* en condiciones *in vitro*.

Una vez los explantes fueron desinfectados se sembraron en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), suplementado con la citoquinina BAP a razón de 3.0 mg L⁻¹ previamente esterilizado en autoclave a 120 °C y 15 libras de presión por 30 minutos.

Tabla 2. Composición del medio MS

COMPONENTES	CANTIDAD (mg/L)	COMPONENTES	CANTIDAD (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
KNO ₃	1900	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ EDTA. 7H ₂ O	37.3
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	Glicina	2
KI	0.83	Tiamina-HCl	0.1
H ₃ BO ₃	6.2	Piridoxina-HCl	0.5
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3	Ácido nicotínico	0.5
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	Mioinositol	100
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	Sacarosa	30

pH	5.7 – 6.0
----	-----------

Fuente: Roca & Mroginski (1993)

3.1.5 Incubación y evaluación de los explantes

Los explantes sembrados se llevaron a cámara de crecimiento donde permanecieron bajo condiciones de oscuridad por 20 días a una temperatura de 28°C esto con el fin de evitar la oxidación de los segmentos nodales. Cuando los explantes mostraron señales de brotación se mantuvieron en oscuridad por 4 días más y luego fueron incubados con un fotoperíodo de 12 horas luz.

Los segmentos nodales contaminados fueron retirados de la sala de incubación y posteriormente esterilizados en autoclave. Los demás explantes se mantuvieron en observación para verificar su brotación y así continuar con la fase de establecimiento.



Figura 7. Siembra de segmentos nodales de *G. angustifolia* en cabina de flujo laminar.

Fuente: Ramírez (2009).

3.1.6 Análisis estadístico

Se aplicó un análisis descriptivo de las variables analizadas en cuanto a contaminación, brotación y segmentos nodales no promisorios, para las concentraciones aplicadas de hipoclorito de sodio al 2% y 3%, en los 3 tiempos de aplicación de 5 minutos, 10 minutos y 15 minutos.

3.1.7 Variables Evaluadas

Las variables dependientes evaluadas en esta investigación, se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Variables evaluadas en el experimento

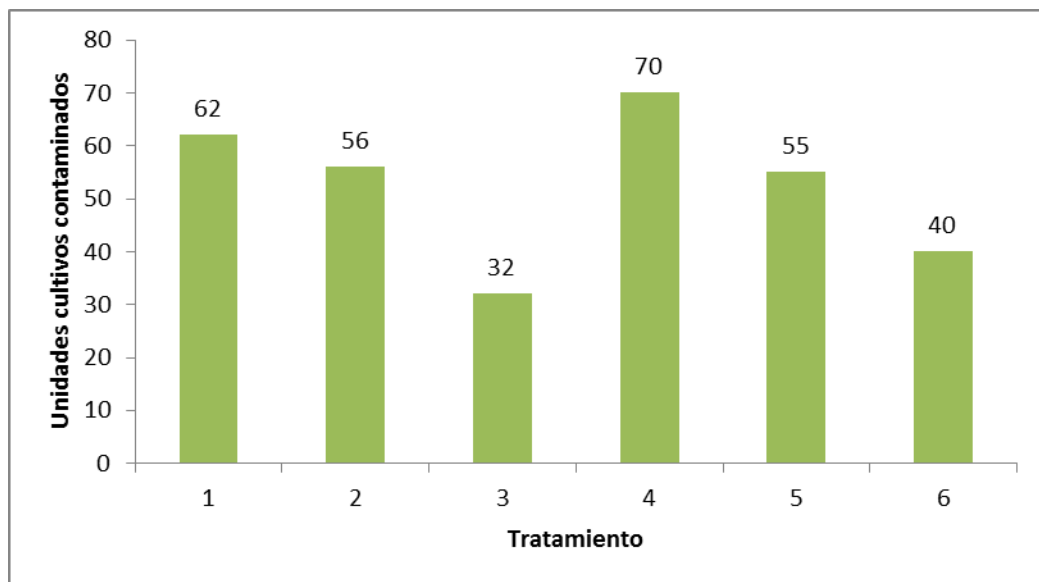
Variables evaluadas	Unidad de medición	Técnica utilizada
Contaminación bacteriana	Unidades	Observación directa
Brotación	Unidades	Observación directa
Plántulas no promisorias	Unidades	Observación directa

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de los tratamientos de desinfección

De acuerdo a los tratamientos de desinfección a los cuales fueron sometidos los explantes de *G. angustifolia*, se obtuvieron los siguientes resultados:

4.1.1 Evaluación de la contaminación



Grafica 1. Contaminación de los segmentos nodales de *G. angustifolia* por tratamientos de desinfección aplicados (Fuente: Ramírez (2013))

En la gráfica 1, observamos que el tratamiento con mejor actividad de desinfección sobre los explantes fue el N° 3, con la aplicación del NaClO al 2% durante 15 minutos, con 32 cultivos contaminados. El tratamiento que reportó mayor contaminación fue el N° 4 con la aplicación del NaClO al 3% por 5 minutos. Al calcular el promedio entre los diferentes tratamientos y tiempos de exposición, se encontró un índice de contaminación alto con un promedio de 50 unidades de cultivos contaminados para el tratamiento con NaOCl al 2% y de 55 unidades de cultivos contaminados para el tratamiento con el NaOCl al 3%, lo que concuerda con lo encontrado por Ramírez *et al.*, (2009), Jiménez *et al.*, (2006), Marulanda *et al.*, (2005) y Borges *et al.*, (2004), quienes reportan una contaminación entre el 20% y 86% en los cultivos *in vitro* de esta especie. Estos resultados se explican porque el hipoclorito de sodio contribuye a la desinfección de los explantes ya que su mecanismo de acción permite el daño de la membrana celular de las bacterias, originando la lisis del microorganismo (Sánchez *et al.*, 2005) Más adelante se observará su acción de acuerdo a la concentración del NaOCl, los tiempos de aplicación y el tiempo total de evaluación en el experimento.

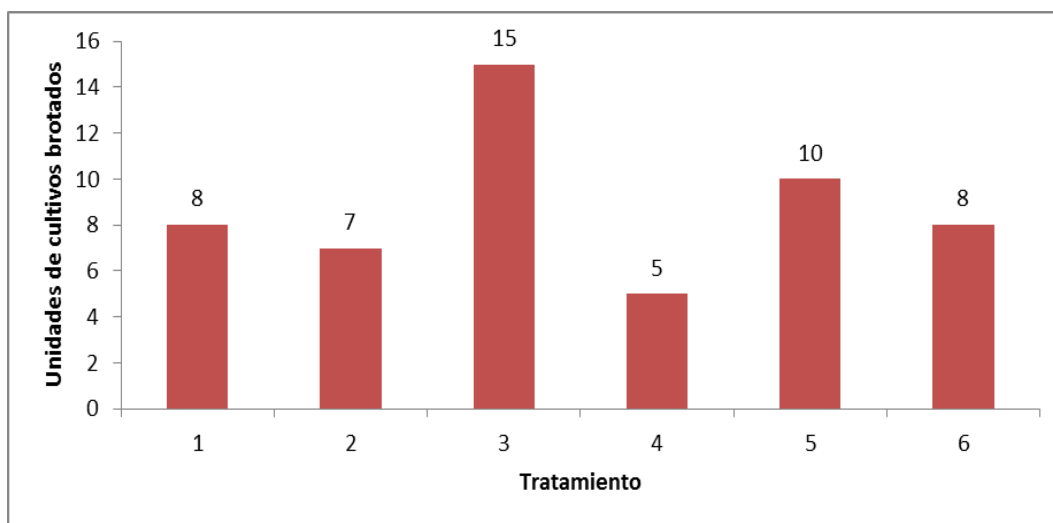
Sigue siendo alto el porcentaje de contaminación de los segmentos nodales de *Guadua angustifolia*, debido a la complejidad de la especie forestal leñosa.



Figura 8. Segmentos nodales contaminados por bacterias
Fuente: Ramírez (2006).

4.1.2 Evaluación de la brotación

Con relación a la brotación de los segmentos nodales, en la gráfica 2 observamos que el tratamiento con el mayor número de segmentos nodales brotados fue el N° 3, con la aplicación del NaOCl al 2% durante 15 minutos, con 15 brotaciones de los explantes de *G. angustifolia*. El tratamiento que reportó menor brotación fue el N° 4 con la aplicación del NaOCl al 3% por 5 minutos.



Grafica 2. Brotación de los segmentos nodales de *G. angustifolia* por tratamientos de desinfección aplicados (Fuente: Ramírez (2013))

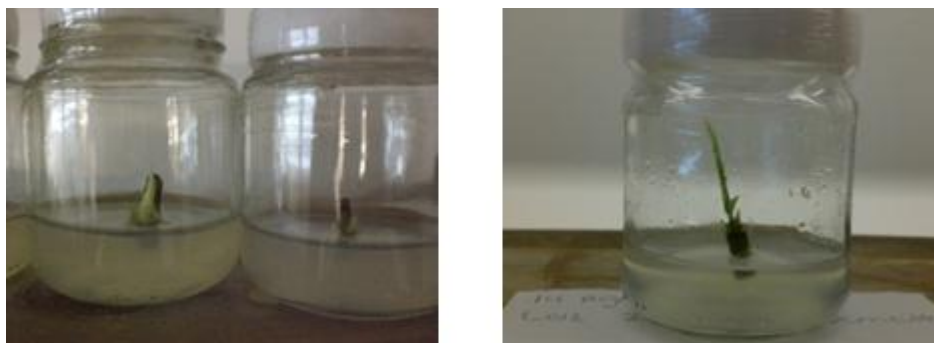
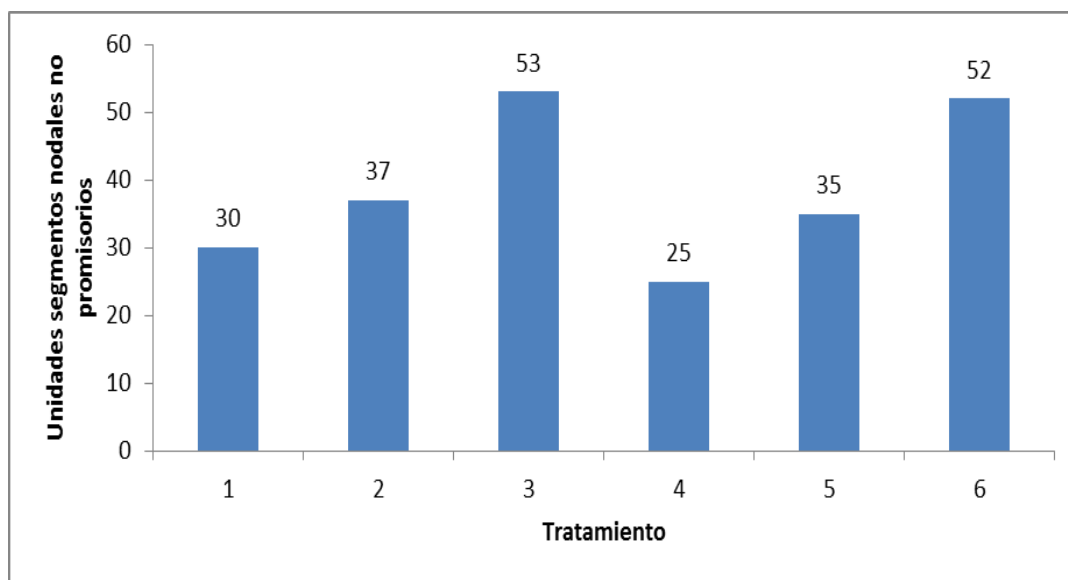


Figura 9. Segmentos nodales de *Guadua angustifolia* en brotación
Fuente: Ramírez (2009)

4.1.3 Evaluación de segmentos nodales no promisorios

En cuanto a los resultados en el número de segmentos nodales no promisorios, en la gráfica 3, observamos que el tratamiento con el mayor número de segmentos nodales no promisorios fue el N° 3, con la aplicación del NaClO al 2% durante 15 minutos. El tratamiento que reportó menor cantidad de explantes no promisorios fue el N° 4 con NaClO al 3% por 5 minutos. No se reporta en la consulta bibliográfica evaluación de los cultivos no promisorios.



Grafica 3. Segmentos nodales no promisorios de *G. angustifolia* por tratamientos de desinfección aplicados (Fuente: Ramírez (2013))

En la figura 10, se observan explantes de *G. angustifolia*, libres de microorganismos contaminantes, pero sin señal de brotación, esto es lo que se llama segmentos nodales no promisorios.



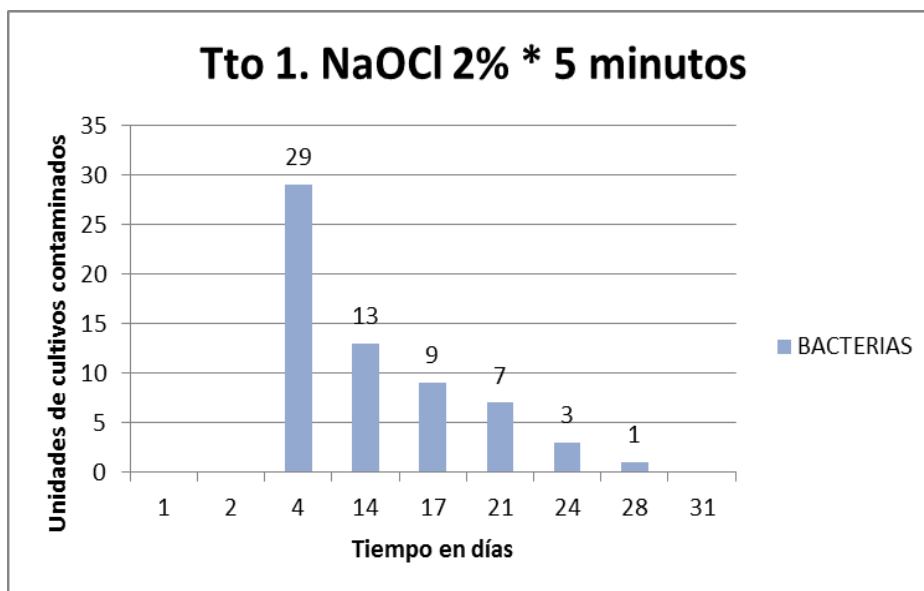
Figura 10. Segmentos nodales de *Guadua angustifolia* no promisorios

Fuente: Ramírez (2009)

4.2 Análisis del tratamiento de NaOCl 2% con relación al tiempo de exposición de los explantes

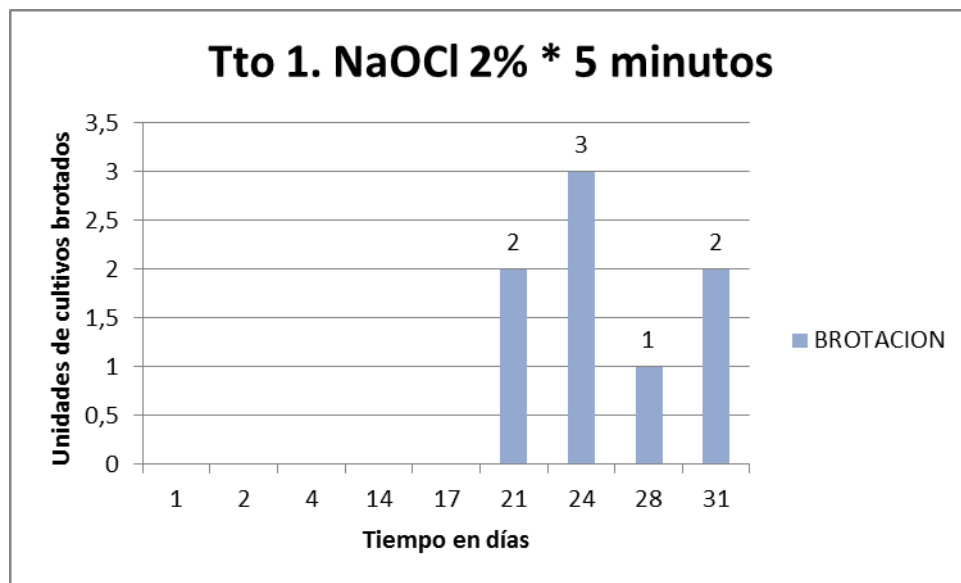
Se realizó el análisis del comportamiento de los explantes en el tratamiento NaOCl 2% de acuerdo con el tiempo de exposición de 5, 10 y 15 minutos, y de acuerdo a los días del desarrollo del experimento en cuanto a su efecto de desinfección, brotación y segmentos nodales no promisorios. A continuación se presentan los resultados encontrados:

4.2.1 NaOCl 2% durante 5 minutos



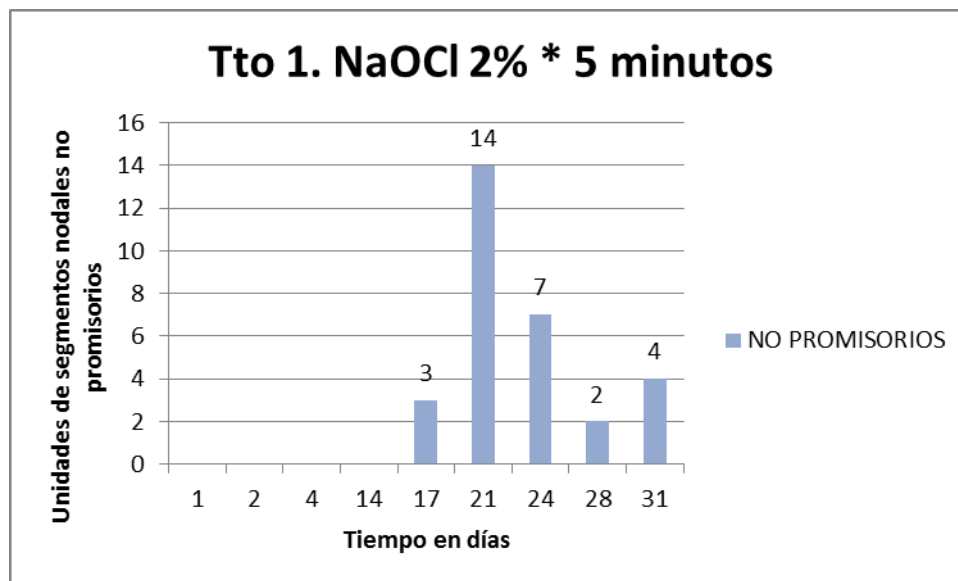
Grafica 4. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación con el tratamiento NaClO 2% x 5 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

En la aplicación del NaClO al 2% durante 5 minutos (Grafica 4), la mayor contaminación se presenta en 29 de los segmentos nodales, en el día 4 a partir de la siembra *in vitro* y disminuye proporcionalmente con el tiempo. Este resultado concuerda con lo reportado por Ramírez *et al.*, (2002), quienes obtuvieron la mayor contaminación entre los primeros 7 a partir de la siembra *in vitro*; y concuerda con lo reportado por Borges *et al.*, (2004) quienes obtuvieron el 20% de contaminación con la aplicación del NaClO al 2% durante 5 min.



Grafica 5. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación con el tratamiento NaClO 2% x 5 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

En cuanto a la variable brotación (Gráfica 5), se encontró que a mayor tiempo de exposición al NaOCl al 2%, hay mayor generación de brotes, obteniendo una brotación de 5 explantes entre los días 21 y 24. Se presenta una sola brotación el día 28, y un leve incremento de 2 cultivos brotados el día 31. Para un total de 8 segmentos nodales brotados en este tratamiento.

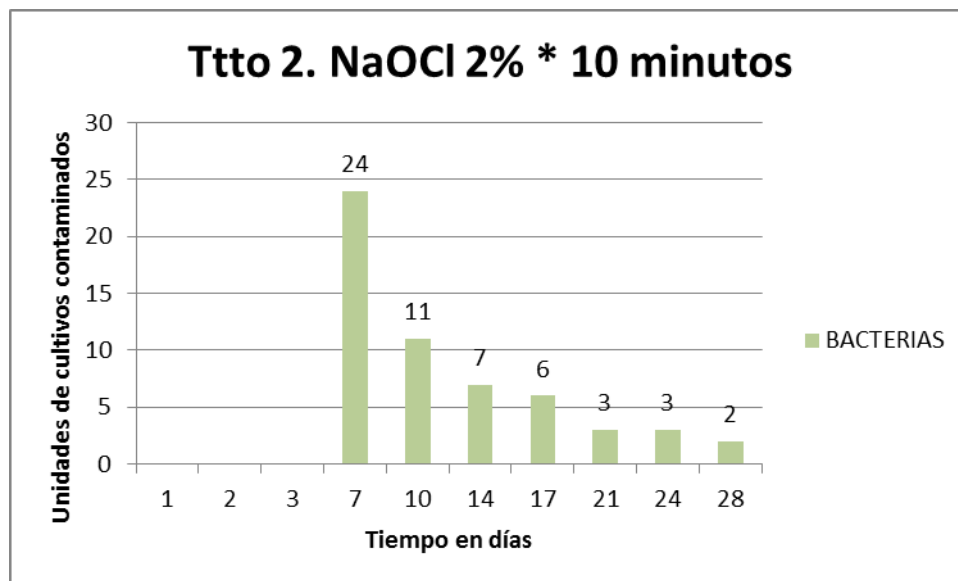


Grafica 6. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios con el tratamiento NaClO 2% x 5 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

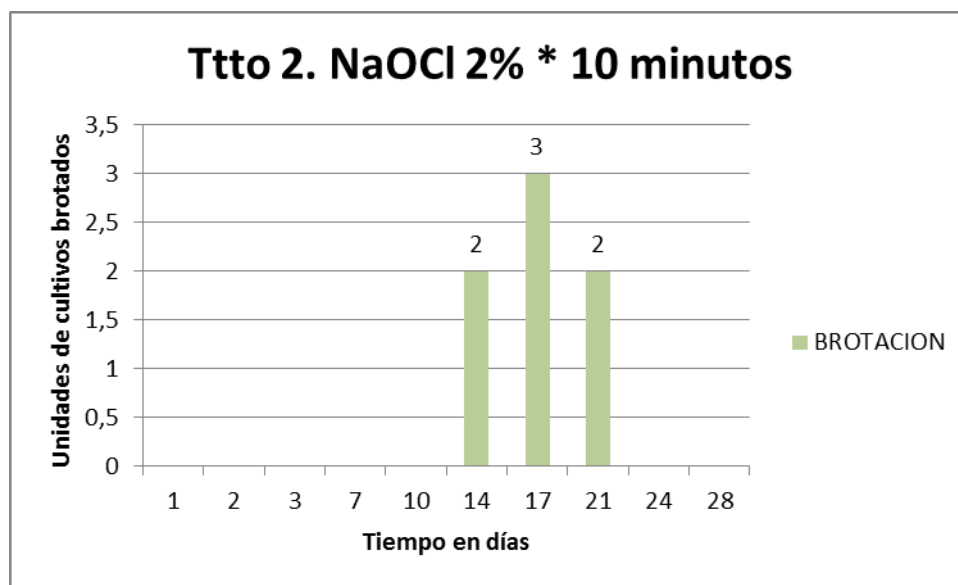
Para los explantes no promisorios (Gráfica 6), se observa un crecimiento exponencial desde el día 17 al 21, siendo este último día el más significativo con 14 cultivos no promisorios. Se presenta una disminución de los cultivos con esta característica a partir del día 24 al 28, con un leve aumento el día 31 con 4 cultivos no promisorios.

4.2.2 NaOCl 2% durante 10 minutos

En la aplicación del NaClO al 2% durante 10 minutos (Gráfica 7), la mayor contaminación se presenta en 24 de los segmentos nodales, en el séptimo día a partir de la siembra *in vitro* y disminuye proporcionalmente con el tiempo. Este resultado concuerda con lo reportado por Ramírez *et al.*, (2002), quienes obtuvieron la mayor contaminación entre los días 2 y 7 a partir de la siembra *in vitro*.

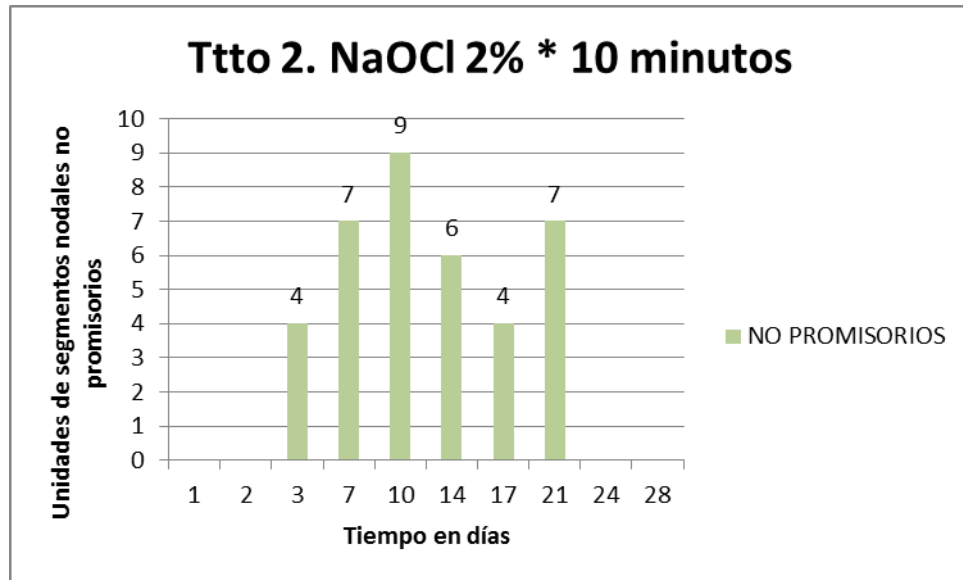


Grafica 7. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación con el tratamiento NaClO 2% x 10 minutos (Fuente: Ramírez (2013))



Grafica 8. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación con el tratamiento NaClO 2% x 10 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

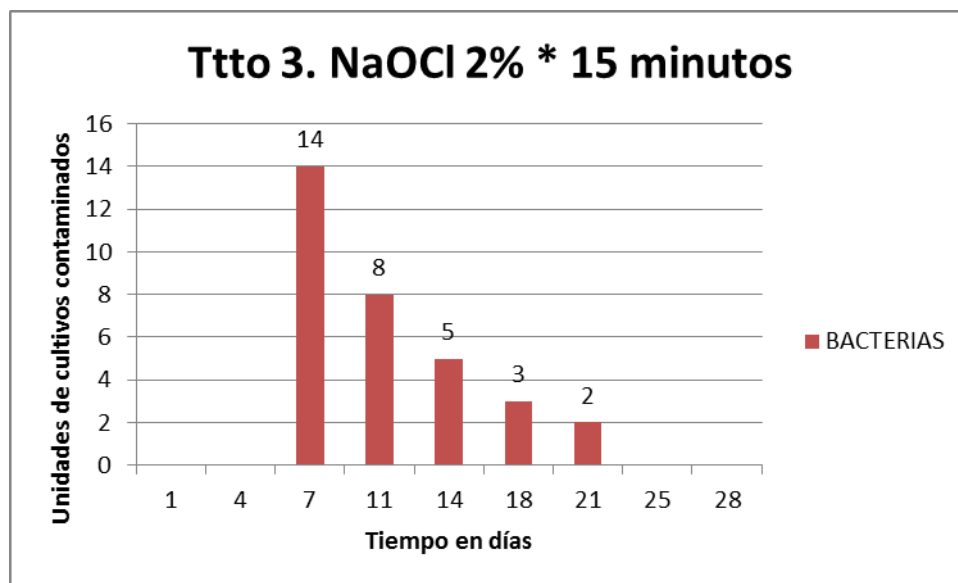
En cuanto a la variable brotación (Gráfica 8), encontramos que a mayor tiempo hay mayor presencia de brotación, obteniendo en total 7 cultivos a partir del día 14 al 21.



Grafica 9. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios con el tratamiento NaClO 2% x 10 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

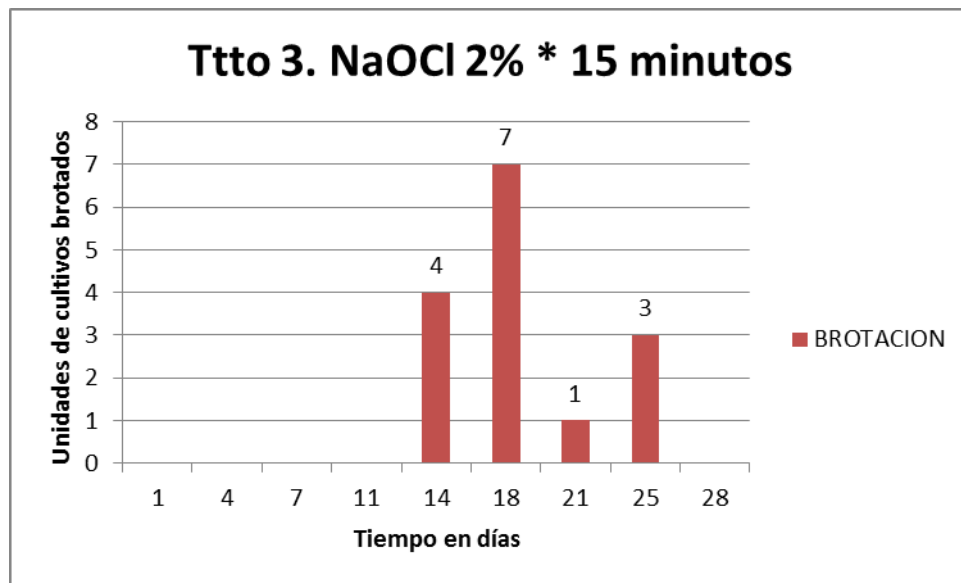
En la gráfica 9, se observa para los explantes no promisorios un crecimiento exponencial desde el día 3 al 10 y una disminución de los cultivos con esta característica a partir del día 14 al 17, con un incremento de 7 cultivos no promisorios el día 21.

4.2.3 NaOCl 2% durante 15 minutos



Grafica 10. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación con el tratamiento NaClO 2% x 15 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

En la aplicación del NaClO al 2% durante 15 minutos (Grafica 10), la contaminación se presenta en 14 de los segmentos nodales, a partir del séptimo día después de la siembra en el cultivo *in vitro*. Esta contaminación disminuye al igual que en los tratamientos 1 y 2 con el paso de los días. Este resultado concuerda con lo reportado por Ramírez *et al.*, (2002), quienes obtuvieron la mayor contaminación en los primeros siete días a partir de la siembra *in vitro*. Estos datos difieren de los resultados reportados por Marulanda *et al.*, (2005), y Borges *et al.*, (2004), quienes con este mismo tratamiento obtuvieron el 80.5% y el 25% de los explantes contaminados respectivamente.

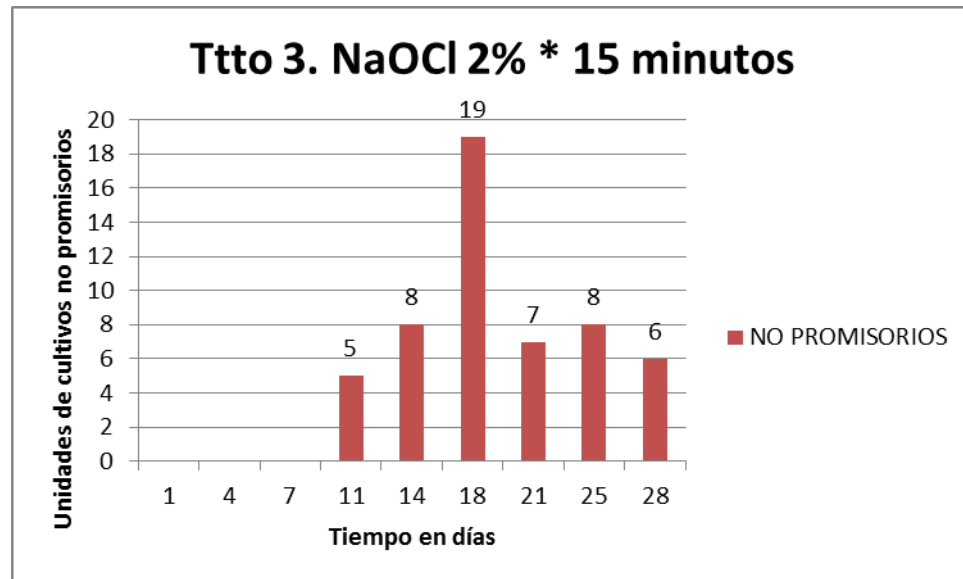


Grafica 11. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación con el tratamiento NaClO 2% x 15 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

En cuanto a la variable brotación (Gráfica 11), encontramos que a mayor tiempo hay mayor presencia de brotación, obteniendo 15 cultivos a partir del día 14 al 25 después de la siembra en el cultivo *in vitro*. Siendo el día 18 el más significativo con 7 cultivos brotados.

Como se puede apreciar en el tratamiento con NaOCl al 2% durante 5, 10 y 15 minutos de aplicación, a medida que transcurre el tiempo del cultivo *in vitro*, disminuye la contaminación y aumenta la brotación de los explantes. Este comportamiento puede atribuirse que la exposición a una concentración media de NaClO en un mayor tiempo podría activar la diferenciación celular de las yemas nodales, y lograr una desinfección adecuada. Bajo estas condiciones los explantes sufren un menor daño fitotóxico en sus tejidos, evitando así su oxidación y facilitándose una regeneración *in vitro* más rápida y eficiente. Esto concuerda con los resultados encontrados por Marulanda *et al.*, (2005) en donde la mayor

brotación se logró con el NaClO al 2% durante 10 min; Borges *et al.*, (2004) lograron la mejor brotación con la doble desinfección de explantes primarios con NaClO al 2% por 5 min., al igual que Freire *et al.*, (2011) quienes obtuvieron 95.81% de brotación aplicando la desinfección de las yemas axilares con NaClO al 1% durante 5 min.



Grafica 12. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios con el tratamiento NaClO 2% x 15 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

Para los explantes no promisorios se observa un aumento de cultivos con esta característica entre los días 11 al 18, siendo este último día es el más representativo con 19 segmentos nodales no promisorios. Hay una disminución proporcional al aumentar el tiempo del cultivo a partir del día 21.

Una concentración del NaClO del 2% por 15 minutos, es más efectivo que someter los explantes a igual concentración por menor tiempo. Esto ha sido corroborado por Lin *et al.*, (2007) quienes obtuvieron su mejor brotación y desinfección con la aplicación del NaClO al 2% durante 30 min en yemas de *Bambusa oldhamii*; y por

Pedroza y Bejarano (2008) en la desinfección de láminas foliares de *Puya santossi*, obtuvieron el mejor resultado con NaOCl al 1% durante 10 min.

Los resultados obtenidos pueden explicarse por que el hipoclorito de sodio tiene mayor oportunidad para llegar al tejido vegetal y hacer efectiva la eliminación de los microorganismos endógenos, sin perjudicar los tejidos del explante, ya que el agente desinfectante disminuye los iones hidroxilo (OH), mediante la formación de agua, reduce el pH, estimulando la presencia de ácido hipocloroso, que en contacto con materia orgánica actúa como solvente, libera cloro que se combina con el grupo amino de las proteínas, formando cloroaminas. El ácido hipocloroso y los iones hipoclorito (OCl^{-1}) llevan a la degradación e hidrólisis de los aminoácidos (Minambiente, 2013), es por esto que reduce la tensión superficial de la membrana celular de las bacterias y permite la lisis del microorganismo (Sánchez *et al.*, 2005). Esto también concuerda con los resultados hallados por Borges *et al.*, (2009) en segmentos uninodales de ñame, donde el mejor porcentaje de desinfección se obtuvo con el NaClO al 1.5% durante 30 min. Además coincide con los resultados reportados por Ramírez *et al.*, (2002) en guanábano donde la mejor desinfección se logró con NaClO al 1% por 10 min.

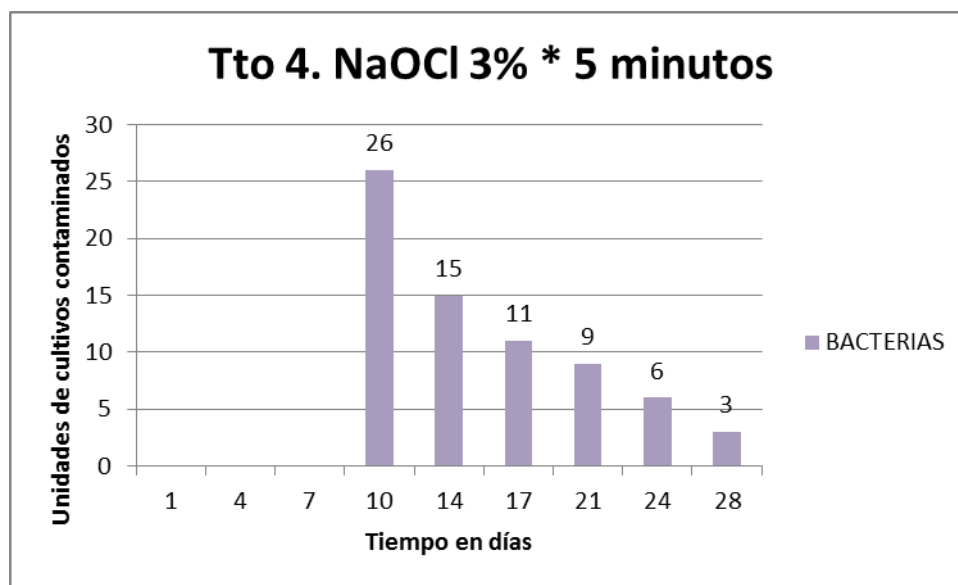
Es así que el hipoclorito tiene como mecanismo de acción sobre los microorganismos, la inhibición de las reacciones enzimáticas y desnaturalización de las proteínas. (Sánchez *et al.*, 2005). Este compuesto actúa como un solvente de materia orgánica, especialmente de ácidos grasos, a quienes transforma en sales de ácidos grasos (jabones) y glicerol, reduciendo la tensión superficial de la solución remanente. Además, el hipoclorito de sodio neutraliza los aminoácidos, formando agua y sales. Con la disminución de iones hidroxilo (OH), mediante la formación de agua, se reduce el pH, estimulando la presencia de ácido hipocloroso que en contacto con componentes orgánicos actúa como solvente, libera cloro que se combina con el grupo amino de las proteínas, formando cloroaminas. El ácido hipocloroso y los iones hipoclorito (OCl^{-1}) llevan a la

degradación e hidrólisis de los aminoácidos. (Minambiente, 2013)

4.3 Análisis del tratamiento de NaOCl 3% en relación con el tiempo de exposición de los explantes

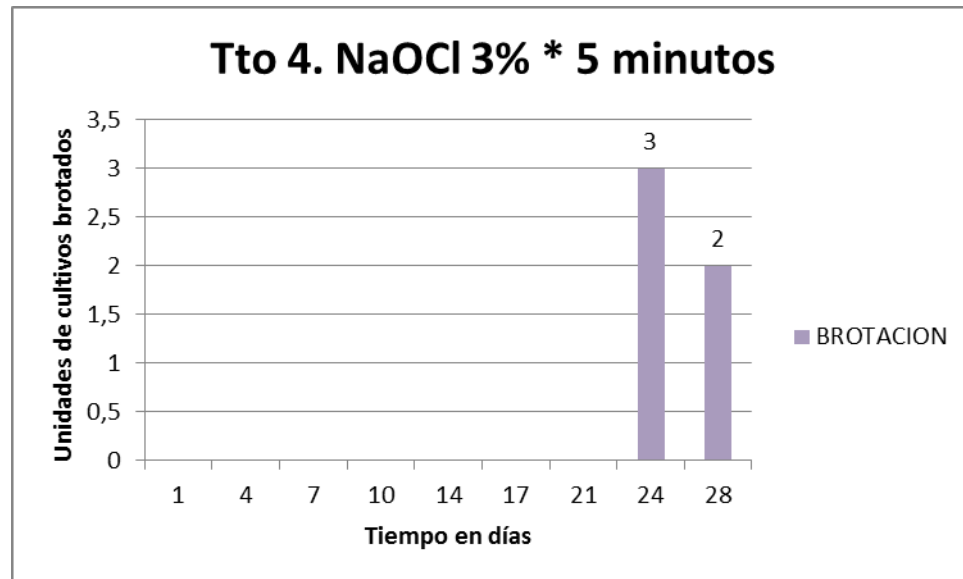
Se realizó el análisis del comportamiento de los explantes en el tratamiento NaOCl 3% de acuerdo con el tiempo de exposición de 5, 10 y 15 minutos, y durante los días del experimento en cuanto a su efecto de desinfección, brotación y segmentos nodales no promisorios. A continuación se presentan los resultados encontrados:

4.3.1 NaOCl 3% durante 5 minutos



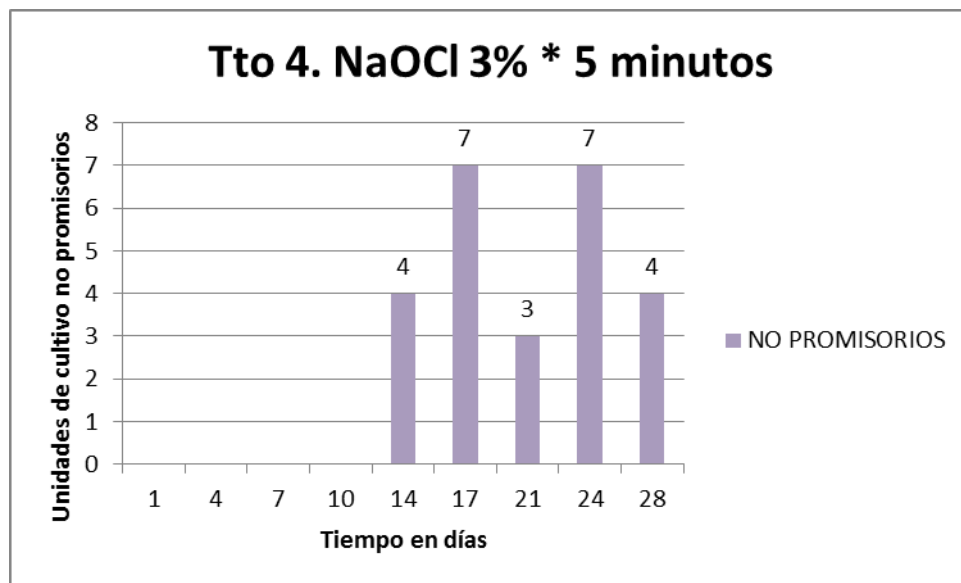
Grafica 13. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación con el tratamiento NaClO 3% x 5 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

En la aplicación del NaClO al 3% durante 5 minutos (Grafica 13), la mayor contaminación se presenta en el día 10 a partir de la siembra en el cultivo *in vitro* en 26 de los segmentos nodales. Posteriormente la contaminación disminuye entre los días 10 y 28.



Grafica 14. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación con el tratamiento NaClO 3% x 5 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

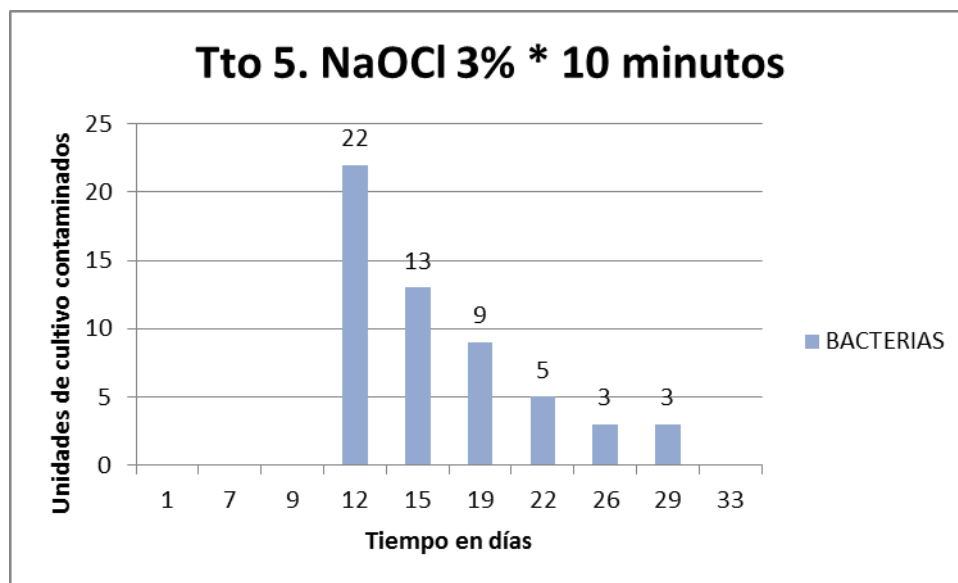
En la gráfica 14, se observa un bajo índice de brotación en este tratamiento con un total de 5 cultivos que se generaron entre el día 24 y 28 después de la siembra *in vitro*. Indicando que una concentración alta con menor tiempo de exposición afecta el desarrollo diferencial de las células, impidiendo la brotación de los segmentos nodales de *Guadua angustifolia*.



Grafica 15. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios con el tratamiento NaClO 3% x 5 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

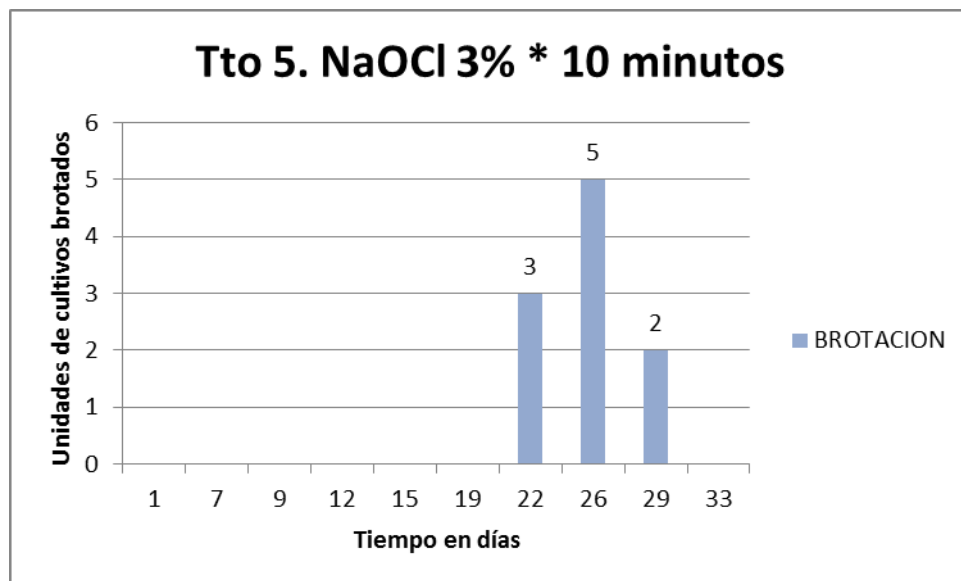
Para los explantes no promisorios (Gráfica 15), se observa un aumento de 11 explantes entre el día 14 y 17, disminuyendo al día 21, con un aumento en el día 24 en 7 nuevos explantes, disminuyendo de nuevo al día 28.

4.3.2 NaOCl al 3% durante 10 minutos



Grafica 16. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación el tratamiento NaClO 3% x 10 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

En la aplicación del NaClO al 3% durante 10 minutos (Grafica 16), la mayor contaminación se presenta en el día 12 a partir de la siembra en el cultivo *in vitro* en 22 de los segmentos nodales sembrados. Esta contaminación disminuye progresivamente a partir del día 15 al 33.



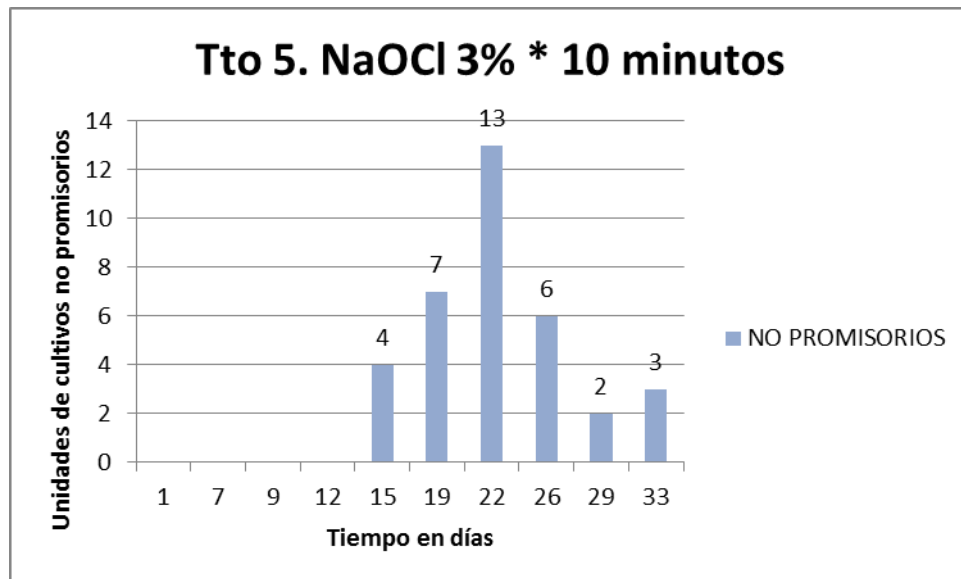
Grafica 17. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación el tratamiento NaClO 3% x 10 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

En la gráfica 17, se aprecia que se presentó una brotación de 10 cultivos entre el día 22 y 29 después de la siembra *in vitro*. Siendo el día 26 el más representativo en este tratamiento con 5 generaciones de brotes de *Guadua angustifolia*.

En la figura 11 y 12, se observan explantes de *G. angustifolia*, libres de microorganismos contaminantes, con brotación.



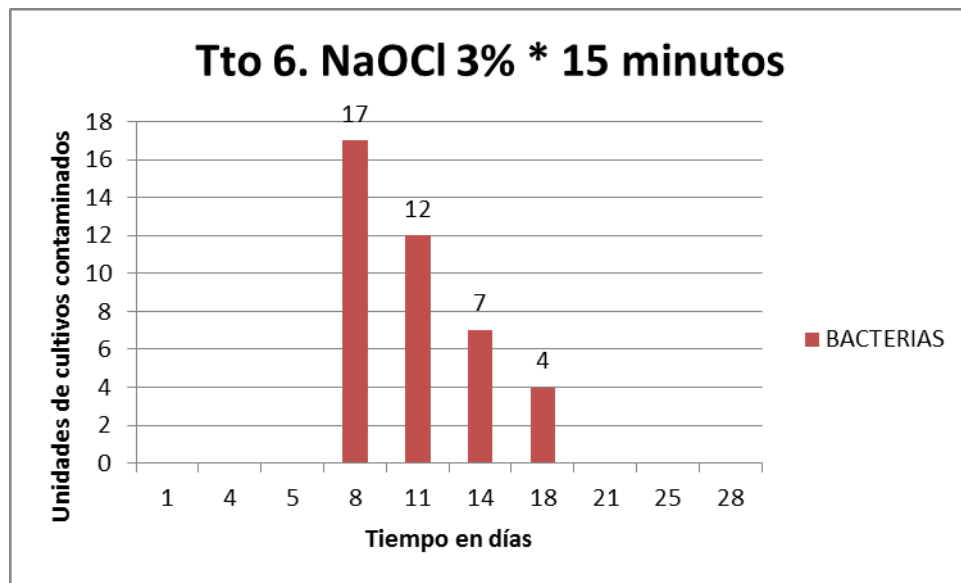
Figura 11. Segmentos nodales de *Guadua angustifolia* en brotación
Fuente: Ramírez (2009)



Grafica 18. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios el tratamiento NaClO 3% x 10 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

Para los explantes no promisorios (Grafica 18), se observa un aumento entre el día 15 y 22, con 24 explantes, siendo el día 22 después de la siembra *in vitro* el más representativo con 13 segmentos nodales con esta característica, disminuyendo su aparición entre el día 26 y 33.

4.3.2 NaOCl al 3% durante 15 minutos

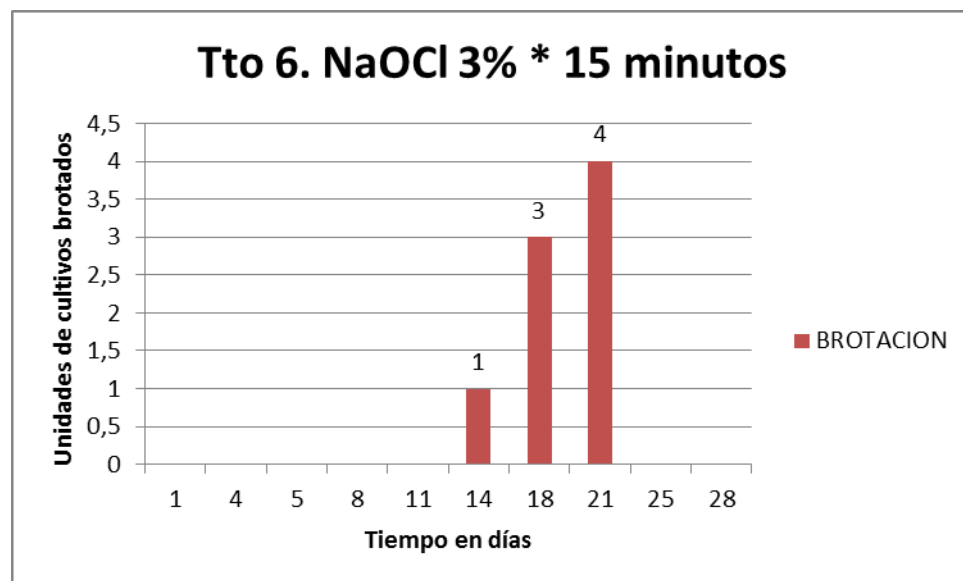


Grafica 19. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable contaminación el tratamiento NaClO 3% x 15 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

En la aplicación del NaClO al 3% durante 15 minutos (Grafica 19), la mayor contaminación se presenta el día 8 a partir de la siembra en el cultivo *in vitro* en 17 explantes. Los mayores índices de contaminación se presenta entre los días 8 y 14, disminuyendo progresivamente con el tiempo.

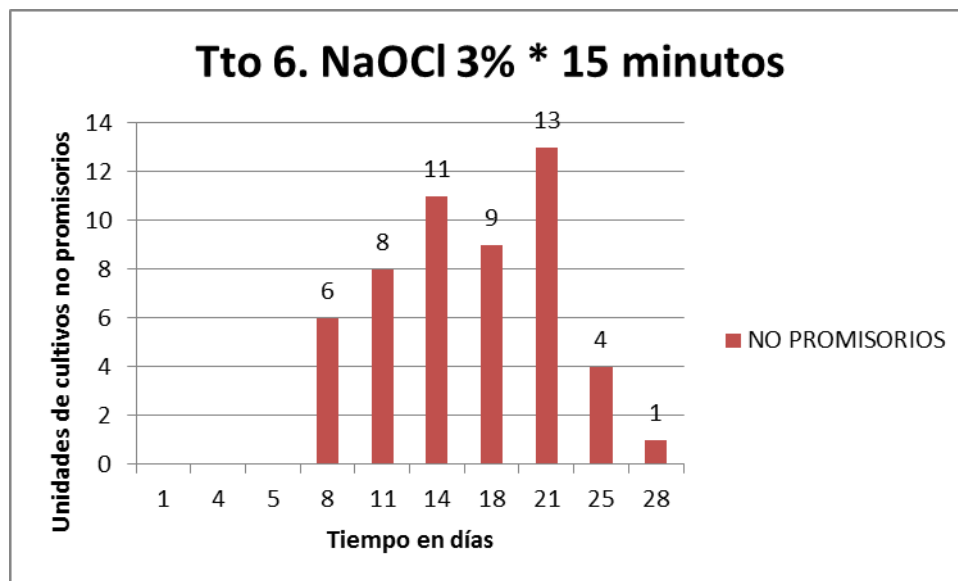
De acuerdo con los resultados obtenidos en tratamientos con concentraciones medias y mayor tiempo de exposición, como el caso del tratamiento 3 NaOCL al 2% por 15 minutos, se presentó una mejor desinfección y brotación. Según lo reportado por Sánchez *et al.*, 2005 existe una estrecha correlación entre la concentración del agente desinfectante y el tiempo necesario para eliminar una determinada fracción de la población bacteriana. Si se modifica la concentración se provocan cambios en el tiempo para lograr un mismo efecto.

Refiriéndose al tiempo no todas las bacterias mueren simultáneamente, ni siquiera cuando se aplica un exceso del agente desinfectante (Sánchez *et al.*, 2005). De ahí que no sea conveniente la aplicación del NaOCl en una concentración alta por un menor tiempo de acción. Según los resultados encontrados en este estudio la concentración del hipoclorito de sodio al 3%, no permite la adecuada desinfección de los explantes, ni la generación de la brotación de los segmentos nodales de *G. angustifolia*, al parecer el mecanismo de acción del NaOCl y del alcohol, destruye los tejidos meritemáticos, generando un aumento en los explantes no promisorios.



Grafica 20. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable brotación el tratamiento NaClO 3% x 15 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

Para la variable brotación (Grafica 20), se encontró con este tratamiento 8 cultivos con generación de brotes entre el día 14 y 21, siendo este último día el de mayor brotación después de la siembra *in vitro* con 4 explantes brotados.



Grafica 21. Análisis comparativo entre el protocolo de desinfección y la variable segmentos nodales no promisorios el tratamiento NaClO 3% x 15 minutos (Fuente: Ramírez (2013))

Para los explantes no promisorios (Grafica 21), se observa un aumento entre el día 8 y 14, con 25 explantes, disminuyendo el día 18, aumentando el día 21, siendo el más representativo con 13 cultivo no promisorios, disminuyendo nuevamente entre el día 25 al 28.

Una vez finalizado el análisis de las variables, y de acuerdo con los resultados presentados para las concentraciones de NaOCl al 2% y NaOCl al 3% durante los diferentes tiempos de aplicación de 5, 10 y 15 minutos respectivamente sobre las unidades de cultivos contaminados, unidades de explantes brotados y segmentos nodales no promisorios, se presentan diferencias que pueden deberse a factores como la procedencia de los explantes y a los tratamientos de prevención utilizados: calidad del agua, aplicación de productos fungistáticos y/o bacteriostáticos, el corte de los explantes y herramientas empleadas (Sánchez *et al.*, 2002), así como también la predesinfección a la cual es sometido el explante. En otras palabras, no todas las plantas madre han sido cultivadas bajo las mismas

condiciones para así obtener los mismos resultados de otras investigaciones, teniendo en cuenta que la manera como realizan el cultivo, el suelo, el clima donde las plantas crecen, y muchos otros aspectos bioclimáticos afectan de manera diferencial las condiciones del cultivo *in vitro*. Cualquier cambio en las concentraciones y los tiempos de exposición de los productos empleados en la predesinfección y en la desinfección hace que varíen las condiciones del cultivo.

Esto concuerda con lo citado en Borges *et al.*, 2006, quien menciona la dificultad de encontrar una microporpagación eficiente para la *Guadua angustifolia*, teniendo en cuenta que los principales inconvenientes son, la contaminación microbiana endógena, la necrosis apical, la hiperhidricidad, la oxidación fenólica, el enraizamiento, la disponibilidad y respuesta estacional de los explantes, y la supervivencia *ex vitro*. Además de la edad y estado del desarrollo de la planta madre.



Figura 12. Segmentos nodales de *Guadua angustifolia* en brotación

Fuente: Ramírez (2009)

Es importante resaltar que la aplicación del NaClO en concentraciones bajas durante mayor tiempo de exposición, permiten un mejor desarrollo celular de los explantes, mientras que una concentración alta a un menor tiempo de exposición impide el adecuado desarrollo de los segmentos nodales de guadua. Esto puede deberse a que el hipoclorito de sodio afecta la permeabilidad celular del microorganismo y de las células vegetales, impidiendo el adecuado desarrollo celular de las células meristemáticas y por lo tanto no genera la brotación del segmento nodal. Según lo citado en Borges *et al.*, 2006, la acumulación de sustancias fenólicas liberadas por el tejido vegetal en el medio de cultivo, son con frecuencia inhibidores del crecimiento y constituyen uno de los problemas más frecuentes asociados con la propagación clonal, ya que alteran y deterioran la composición química del medio de cultivo, causando progresivamente la muerte del material vegetal.

Además como se mencionó anteriormente, Cada cultivo tiene características independientes, como el corte, el estado del segmento nodal, la planta madre de la cual fue extraído, particularidades que hacen que cada cultivo sea una repetición de la investigación. La *G. angustifolia*, como se ha mencionado anteriormente es una especie leñosa que reporta altos índices de contaminación y por lo tanto, requiere de unos pretratamientos y tratamientos más agresivos, en este caso los segmentos nodales fueron prelavados para hacer un arrastre de macromoléculas en su exterior y sumergidos en alcohol al 70% durante 2 min., que también ayuda a romper la tensión superficial de la membrana celular de los microorganismos coadyuvando al hipoclorito de sodio a eliminar los agentes microbianos que impiden el adecuado establecimiento del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia*, pero debido a su compleja fisiología no fueron suficientes estos procedimientos, ni la desinfección con NaClO.

A través de la observación de los cultivos de los segmentos nodales de *G. angustifolia*, se evidenció la presencia de bacterias como fuente contaminante a los 3 días. Es de resaltar que no se presentó contaminación por hongos, aunque

no fue un objetivo de este estudio, se puede inferir que las prácticas fitosanitarias aplicadas a las plantas madre en el invernadero, como la continua fumigación con productos fungistáticos y el riego con agua destilada, contribuyeron en buena medida a que no se hayan presentado hongos en el cultivo *in vitro*. De acuerdo con Sánchez *et al.*, 2005; no todas las bacterias mueren simultáneamente en el momento de la desinfección, es por ello que observamos según estos resultados, que a medida que transcurre el tiempo prevalece el crecimiento bacteriano en el cultivo *in vitro*.

5 CONCLUSIONES

- El tratamiento con el cual se logró la mejor desinfección y brotación de los segmentos nodales de *Guadua angustifolia* se obtuvo con la aplicación del NaClO al 2% durante 15 minutos.
- El tratamiento que menor resultado obtuvo con respecto a la desinfección y brotación de los explantes fue el NaClO al 3% por 5 minutos.
- Cuando se aumenta el tiempo de exposición al agente desinfectante, se disminuye el porcentaje de contaminación bacteriana, reflejándose un mayor efecto bactericida del NaClO en los segmentos nodales de *Guadua angustifolia*.
- El uso del hipoclorito de sodio, es una alternativa para la desinfección del material vegetal en las concentraciones y tiempos de exposición adecuados.
- Con los resultados obtenidos se reconfirma que aún no se cuenta con protocolos eficientes de micropropagación, debido a la complejidad del establecimiento en el cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia*.

6 RECOMENDACIONES

- Para establecer *in vitro* la *Guadua angustifolia* se recomienda evaluar concentraciones bajas por mayores tiempos de exposición al hipoclorito de sodio.
- Se recomienda realizar estudios que involucren el uso de antibióticos en la desinfección de los explantes o la adición en el medio de cultivo, como complemento en la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO).
- Se recomienda realizar pretratamientos más agresivos como el uso del alcohol al 70% por más tiempo, para así coadyuvar al NaClO a realizar una adecuada desinfección de los segmentos nodales de *G. angustifolia*.

REFERENCIAS

- Bag N, Chandra S, Man L, Nandi S. 2000. Micropropagation of dev-ringal *Thamnocalamus spathiflorus* (Trin) Munro a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. *Plant Science*, 156: 125-135. India.
- Borges M, Estrada E, Pérez I, Meneses S. 2009. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Centro de estudios de biotecnología vegetal*. Facultad de ciencias agrícolas, Universidad de Granma, Bayamo 85 100. Cuba.
- Borges M, Ros C, Castellanos Y, Silvio M, Velásquez R. 2004. Efecto de diferente métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotechnología vegetal* Vol. 4 Nº 4: 237-242. Cuba.
- Cruz S, Gómez G. 2000. Caracterización morfológica y anatómica de cuatro biotipos de *Guadua angustifolia* Kunth en el Quindío. Tesis de pregrado en Licenciatura en Biología. Universidad del Quindío. Armenia. Colombia.
- Cruz M, García Y, Sánchez C, Alvarado Y, Acosta M, Roque B, Leiva M, Freire M. 2007. Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotechnología vegetal* Vol. 7, Nº 1:9-13. Cuba.
- Fonturbel F. 2001. Los vitropatógenos: consideraciones generales, detención y eliminación. *Revista Biología.org*, Vol.6. Disponible: <http://www.biologia.org/revista/numero6/vitropatogenos.html> [Acceso: Agosto 13, 2010].
- Freire M, García Y, Hurtado O, León M, Fajardo L, Cruz M, Sánchez C, Alvarado Y, Acosta M, Tejada M, Roque B, Leiva M. 2011. Combinación de técnicas biotecnológicas y tradicionales para la propagación de diferentes especies de bambú. *Biotechnología vegetal* Vol. 11, Nº 3:163 -168. Cuba.
- García J, Freire M, Fajardo L, Tejada M, Reyes M. 2007. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata*. *Biotechnología vegetal* Vol. 7, Nº 3: 155-159. Cuba

- García Y, Freire M, Pérez B, Hurtado O. 2010. Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. en diferentes épocas del año. *Biotecnología vegetal* Vol. 10, Nº 3: 151-156. Cuba
- Gielis J, Peeters H, Gillis K, Oprins J. 2002. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. Proceedings of the twentieth international eucarpia symposium, section ornamentals – Strategies for new ornamentals. *Acta horticulturae* Number 552: 195-203.
- Giraldo E, Sabogal A. 2007. Una alternativa sostenible: La Guadua técnicas de cultivo y manejo. Corporación Autónoma Regional del Quindío. 3ra Ed. Armenia, Colombia.
- Gómez G, Agudelo C, 2003. Aspectos fenológicos de “*Guadua angustifolia*”. *Revista de investigaciones*. Universidad del Quindío. Vol. 4 Nº 12. Armenia, Quindío.
- Gómez G. 2005. El Quindío es guadua. Centro de investigaciones biológicas. Universidad del Quindío. (En prensa)
- Gutiérrez L, Marulanda M, López R. 2004. Multiplicación de brotes de *Guadua angustifolia* Kunth, mediante el sistema de inmersión temporal. (SIT). Grupo de Biodiversidad y Biotecnología. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira. Simposio Internacional de Guadua. 7 p.
- Jiménez V, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montie M. 2006. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant cell tiss. Org. Cult.* 86: 389 - 395.
- Lárraga N. 2011. Propagación *in vitro* y convencional de tres especies de Bambú. Puebla, México, 8-12 p. Tesis. Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Posgrado en estrategias para el desarrollo agrícola regional.
- Leifert C, Ritchie J, Waites W. 1991. Contaminants of plant tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Oxford. Estados Unidos. 452 – 469 p.
- Lin S, Kalpana K, Chang W, Lin S. 2007. Improving multiple shoot proliferation in bamboo mosaic virus – free *Bambusa oldhamii* Munro propagation by liquid culture. *Hortscience* 42 (5): 1243 - 1246 p. Taiwan, China.

- Marulanda M, Gutiérrez L, Uribe M, Márquez M. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia*. *Biotecnología vegetal*. Vol. 6 N° 2. VII Simposio Internacional. Disponible: http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc_download/192-b [Acceso: Junio 7, 2010]
- Marulanda M, Gutiérrez L. 2003. Desarrollo de métodos de propagación *in vitro* y conservación de germoplasma de *Guadua angustifolia* Kunth. *Universidad Tecnológica de Pereira*, Colombia. 7 p.
- Ministerio del medio ambiente. Hipoclorito de sodio. [en línea] Abril de 2013. Disponible en: <http://www.minambiente.gov.co/documentos/Guia18.pdf>
- Pedroza J, Bejarano A. 2008. Propagación vegetativa *in vitro* de *Puya santossi*. *Revista Colombiana de biotecnología*. Vol. X N°1: 36 – 48 p. Bogotá.
- Pedroza J, Tupaz W. 2008. Micropropagación de *Ilex kunthiana* Triana & Planchon (Aquifoliaceae), una especie de gran importancia en programas de revegetalización. *Revista Colombiana de biotecnología*. Vol. X N° 2: 72 – 84p. Bogotá.
- Pérez A. 2006. *Guadua angustifolia* Kunth. Catálogo de la biodiversidad de Colombia. Disponible: <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=280&method=displayAAT>. [Acceso: Mayo 15, 2010]
- Ramanayake S, Maddegoda M, Vitharana M, Chaturani G. 2008. Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. *Scientia Horticulturae*. 118: 270-273. Sri Lanka.
- Ramírez L. Castaño S, López R. 2009. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista Investigaciones*. Universidad del Quindío N° 19: 151-158 p.
- Ramírez M, Urdaneta A, León S. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes maduros del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Rev. Fac. Agron.* Vol 19 N° 1. Venezuela.
- Rey, A, Leal, L. 2009, Protocolo académico del curso de Biotecnología II. Especialización en Mejoramiento Genético y Biotecnología Agraria. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.

- Roca W, Mroginski L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. *Centro internacional de agricultura tropical*. Cali, Colombia.
- Rodríguez N. 2003. Propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth (bambú), importancia y ventajas comparativas. *In* Memorias III Seminario Internacional del Bambú. Programa Agricultura Tropical Sostenible. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales. Fundación Polar, Gobernación del Estado Yaracuy, Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. San Felipe, Estado Yaracuy, Venezuela.
- Sánchez M, Marmolejo F, Bravo N. 2002. Microbiología y aspectos fundamentales. *Universidad Nacional*. Sede Palmira. Cali, Colombia. 142 – 159 p.
- Sánchez L, Sáens E. 2005. Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana*. Volúmen 15. N° 2.
- Suárez I, Araméndiz H, Pastrana I. 2009. Micropropagación de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín* 62 (2): 5135-5143.
- Torres D. 1990. El cultivo de la guadua. Una alternativa rentable que proporciona protección de cuencas hidrográficas, conservación de suelos y material de construcción. *Revista Agricultura de las Américas*. La guadua. Mayo / junio, 1990. Año 39, N° 3.